

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-244382

⑪ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月24日

C 12 N 15/00

7115-4B

C 07 H 21/04

7138-4C

C 07 K 13/00

8318-4H

C 12 P 13/22

A-7236-4B ※審査請求 未請求 発明の数 8 (全20頁)

⑭ 発明の名称 トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされる
ペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法
及びトリプトファンの製造法

⑮ 特 願 昭61-87600

⑯ 出 願 昭61(1986)4月16日

特許法第30条第1項適用 昭和60年11月15日 日本分子生物学会発行の「第8回日本分子生物学会年
会プログラム・講演要旨集」により発表

⑰ 発 明 者 松 井 和 彦 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者 佐 野 孝 之 輔 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者 三 輪 清 志 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者 大 坪 栄 一 東京都文京区西片1-13-6
⑰ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファン
オペロンにコードされるペプチド及び蛋白、
トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用
方法及びトリプトファンの製造法

2. 特許請求の範囲

1) m-RNA の合成をコントロールするオペレー
ター領域、m-RNA の合成をコントロールするプロ
モーター領域、m-RNA の合成をコントロールする
アテニュエーター領域、蛋白合成に必要なリボゾ
ームとm-RNA との結合領域、リーダーペプチドを
コードする領域、トリプトファン合成系の酵素群
をコードする領域及び最後にm-RNA の合成を停止
させるシグナルを形成するターミネーター領域が
含まれる下記第一式に示される配列よりなるDNA

CCGGCTTGTG GGCATTCTGT TCCCTGAGGT GCGTAAATCC CAAGAATTGT GGGATATGGC GCACCGTGTG GCTGGCCCGT TGTGGGTGCT CTCGGCAGTT
 GGGCCAACAC CCGTAAGCAC AGGGAATCCA CGCATTIAGG GTTCITTAACA CCCATATACC GGTGGCACAG CGACCGGGCA ACACCCACGA CAGCCCTCAA
 TCCTTTGTTA TTCCCTCGCT AGTTCCGTTT GTGGCCTTCT GGTTCGATGT GGCTGGTCTG GGCATTGGGT GTTGTGCGTG GCATCGTGTT CATTCGCATG
 AGGAAACAAT AACGGAGCGA TCAACGCAAA CACCGCAAGA CCAACCTACA CGGACCAGCA CCGTAACCCA CAACAGCGAC GGTAGCACAA GTAACCGTAC
 GGTGCGGGTA TGGCTGGCGA TACTGTTGCG ATGGTTGATG CGAACCGAGT CCGGAAACCC CGCAGGCGCC TGTTCGCGT GAAATTGAAG AGGAGGCGCG
 CCACGCCCAT ACCGACGCGT ATGACAACGC TACCAACTAC GCTTGGCTCA GCGCTTTGGG GCGTCCGCGG ACDAAGGCGA CTTTAACITC TCCTCGGGCC
 TGGTGTGACT ATTACCTCGC CGATTATCAA CAAGACTCCG CTGAATGCCC CCAAGATTGA CTTCGATGCA GTGCGTAGAG CTGCGGAAAC TACACAAGAA
 ACCACACTGA TAATGGAGCG GCTAATAGTT GTTCTGAGCG GACTTACGGG GGTTCCTAAT GAACCTACGT CACGCATCTC GACGCCITTC ATGTGTTCTT
 CCAAAAATG ATTAATAATT GAGACAAGCT TCCCACTATG TCATAAAGTC CCATTTTCTG AATAACTCTT GTCTCAGTCA AAGCACCCAG TGGTGGTGGC
 GCGTTTTTAC TAATTATTAA CTCGTTCGA AGGCTGATAC ACTATTTACG GGTAAACAC TTATTGAGAA CAGAGTCAGT TTCGTGGGTC ACCACCACCG
 GCGCTAATA AGCGAGCGTG ACACCTCAAG TTGTTTTAC TTTGATGAAT TTTTAAAGGC TCGTACTTCG TTCGACGAAG AAGCGGGCGT TTTGTGGTTT
 CCGGATTGAT TCGCTCGGAC TGTGGAGTTC AACAAAAGTG AAACCTACTTA AAAAAATTCG AGCATGAAGC AAGCTGCTTC TTGCGCCGGA AAACACCAAA
 TTAGCCCAAC ACCGCAAGC CCGGATCGA ATCAAGCTCG CAGCGAGTAA TTATTGATG TTTCCAGAA AGGCTTCAGC CCCACAATGA TTTCTCGGT
 AATCGGCTGT TGGCGGTTCC GGACCTAGCT TACTTCGAGC GTGCTCATTT AATAAATAC AAAGGGTCTT TCCGAAGTCG GGTGTACT AAAGGAGCCA
 AGGTGCCCCA TGAGCAGGAA TCCCATGTT TTCTCCCTAG ATGTCCGCTA TCACGAGCAT GCTTCTCGCT TGTTCGCCA CTTCGGTGGC ACAACCGCAG
 TCCACGGGGT ACTGCTGCTT AGGGGTACAA AAGAGGGATC TACAGCGAT AGTGCTCTA CGAAGACGCA ACAACCGGT GAACCCACCG TGTGGGCTC
 ATGATGACGC CCGTGTGAA AGCGCTGATA TCACCACCAA GAATGGTATT TCTTCCCTCG CGGTGTGAA GAGTTCGGTG CGCATTACGT GCACGGGCAA
 TACTACCTCG GGACAACCTT TCGGCACTAT AGTGGTGGT CTTACCATAA AGRAGGGAGC GCCACAACCT CTCAGCCAC GGTAAATGCA CGRPGCCGTT

 CACGGTGGTA AGCGAGCCGC TGACGGACTC GGGTAGGGCA GTGGTGGCG GCCTAACACA GCAGCTTGGC CAGTACAACA CCGCAGAGAA CACCTTTAGC
 GTGCCACCAT TCGCTCGGGC ACTGCTGAG CCCATCCGCT CACCAACCGC CGGATTGTGT CGTCAACCG GTCATGTGT GCGCTCTCTT GTGGAAATCG
 TTCCCGCGCT CCGATCGGT TGATGAGCGC GAGCGCTCA CCGCACCAAG CACCATCGAA GTGCTGGCA AGTTGCAGTT CGAGTCCGGC TACAGCGAGC
 AAGGGCGGGA GGCTAGCCCA ACTACTCGCG CTGCGGAGT GCGCTGCTTC GTGGTAGCTT CAGGACCGCT TCAACCTCAA GCTCAGCGCG ATGTGCTGCG
 CGTCCCTGCC ACTGCTCATG GCGGGTTTC CTTTGTATTT CTAGAAACC TTTGAAACCG TCCCGCGAGT CGAGGAAGC GTCAACACTT ACCCGGATTA
 GCAGGGACGG TGACGAGTAC CGCCAAAGC GGAACATAAA GAATCTTTG AAACCTTTGCG AGGGCGGCTA GCTCCTTTG CAGTGTGTA TGGGCTAAT
 CCAGTTCTGTC CTCGCGGAAA TCGTCTGGA CATCAATCAG CAGGACCGA CCGCCAAACT CACCGGCGTC TCCAACGCC CAGGCGAGCT CGAGGCGGAG
 GGTCAAGCAG GAGCGGCTTT AGCAGGACCT GTAGTTAGTG GTCTGCTCT GCGGTTTGA GTGGCCGAG AGGTTGCGGG GTCCGCTCGA CTTCCGCTC
 CTCAACAAGC TTTGATTGCT TATCGAGCGC GCGCTCCCG CAACCGAACA GCGCTACCA ACCACGCTC ACCAGGGCGA CACTGTTCG GTTGTGGCTG
 GAGTTGTTG AAAGTAACGA ATAGCTGCG CGGAGGGGG GTTGCTGTGT CCGGATGCTT TGGTGGGAG TGTGCGCGT GTGAGAACCG CAACACCGAC
 ATATTCCCGA TGCTCAGTTC CGCACTCAGA TCAATCAGCT GAAAGAAAAC ATTTACAAGC GTGACATCTA CCAAGTTGTC CCGCGCGGCA CTTTACCGCG
 ATATTGGGCT ACGAGTCAAG GCGTGAATCT AGTTACTCGA CTTTCTTTT TAAATGTTG CACTGTAGAT GGTTCACAG GCGCGCGCGT GAAAGTGGCG
 ACCATGTCCT GATGCATTTC CTGCTTATCT GCAGCTGCGT GCCACCAACC CGTGGCGGTA CATGTTCTAT ATCCGTGGAC TCAACGAAGG TCGCTGCTAT
 TGGTACAGGA CTACGTAGC GACGAATAGA CGTCCACCGA CCGTGGTTG GACGCGCAT GTACAGATA TAGGCACCTG AGTTGCTTCC AGCGAGGATA
 GAACTTTTTC GCGCATCCCC TGAGTCCAAC CTCAGTTCA CCGCTGCTAA CCGTGAGCTG CAGCTGTACC CAATCGCAGG TACCCGCGCG CCGTGGACTCA
 CTTGAAAAAC CGCTAGGGG ACTCAGGTTG GAGTTCAAGT GCGGACGATT GCGACTCGAC GTGACATGG GTTAGCGTCC ATGGCGGGGG GCACCTGACT
 ACCCAGATGG CTCCATCAAC GATGAGCTAG ATATCGGCAA TGAGTTGGAT ATGCGCACTG ATGCCAAGA GATCGCGGAC GACACCATCG TGTGCTATCT
 TGGTCTACCG GAGGTAGTTG CTACTGATC TATAGGCGTT ACTCAACCTA TACGCGTGAC TACGGTTTCT CTAGCGCGCTG CTGTGGTACG AACAGCTAGA
 CGCCCGGAAC GAGCTCGGCC GCGTCTCGGT CCCAGCGTCG CCGCGGGTTC CGGATCTTTT GCAGGTGGAT CGCTATTCCC GCGTGTATGCA CTTGCTGCTC
 GCGGCGGTTG CTGAGGCGGG CGCAGAGCCA GGTTCGACG CCGCGCCAAC GCTAGAAAA CGTCCACCTA GGCATAAGGG CGCAGTACGT GAACACAGG

特開昭62-244382 (3)

CGTGTACGG CGACGTTGGA CCCAGAGCTT GATGCTTTGG AGCCCTATCG GCGGTGCATG AATATGGGCA CGTTGACCGG CGCTCCGAAG TTGCGCGCTA
GCACACTGCC GCTGCAACCT GGGTCTCGAA CTACGAAACC TCGGGAATAG CCGCACGTAC TTATACCCGT GCAACTGGCC GCGAGGCTTC AACGCGCGAT

TGGAGCTGTT GCGCGCGCTC GAAAAGCGCA GCGGTGGTTC TTATGGTGGG GCAGTGGGGT ACCTGCGCGG CAATGGCGAT ATGGATAATT GCATTGTTAT
ACCTCGACAA CCGCGCGCAG CTTTTCGGCT CCGCACCAAG AATACCACCC CGTACCOCOA TGGACGCGCC GTTACCCTTA TACCTATTAA CGTAACAATA

TGCTTCGGCG TTTGTCCAGG ATGGTCTGGC TGCTGTGCAG GCTGTGCTG CTGTGCTCGG CGATTCTAAT CCTCAATCTG AAGCGCATGA GACGTTGCAC
AGCAAGCGCG AAACAGGTCC TACCACACCG ACGACAGCTC CGACCACGAC CACACCAGGC GCTAAGATTA CGAGTTAGAC TTGCGCTACT CTGCAACGTC

AAGCGCTATG CGGTGTTGAA TGCCATTGCG CTGTGCTGCT GTTCCACTTT GGAGGTCATC CGATCACACA CGTTGTCTC ATTGATAATC ACGATTCTTT
TTCCGCATAC GGCACAACCT ACGGTAACCG GAACGACGAC CAAGGTGAAA CCTCCAGTAG GCTACTGTGT GCAACAAGAG TAACATATTAG TGCTAAGAAA

TGCTTACAA CTTGTGGATG CGTTGCGCGT GCGCGGTTAT AAGTGCACGG TGTTCGCGAA TACGCTGCCA GTTGAAACCA TTTTGGCAGC CAACCGCGAC
ACAGATGTTG GACCACTTAC GCAAGCGGCA CCGGCAATA TTACGCTGCC ACAAGGCGTT ATGCCACGGT CAACCTTGGT AAAACCGCTC GTTGGCGCTG

CTGATCTGCC TTTCACTGG ACCTGCTTAC CTTGCGCATG CCGGCAACAT GATGGCGCTG ATCGAGCGCA CACTCGGCCA GATTCTTTA CTGCGTATT
GACTAGCGG AAAGTGEACC TGGACCAATG GACGCGCTAC CCGCTTGTG CTACGCGGAC TAGCTCGCT GTGAGCGCGT CTAGGGAAT GACCCATAAA

GCGTCGGCTA CGAGGCACTC ATCGAATACC ACGGCGGCAA GGTGAGCGT TGTGCGCTG TGCACGGCAC CACCGACAAC ATGATCTTA CTGATGCAGC
CGGAGCGCAT GGTCCGTGAG TAGCTTATGG TCGCGCGCTT CCAACTCGGA ACACCGGGAC ACGTGGCGTG GTGGCTGTTG TACTAGGAAT GACTACGTC

TGTGCAGAGC CTTGTTTTG CAGGTCTTGC CACTGATGTT GAGCCTGATC ATCCAGAAGT CCCAGGCGCG AAGGTTCCAA TTGCGCGTTA TCACTCACTG
ACAGCTCTCG GGACAAAAC GTCCAGAAGC GTCACTACAA CTCGCACTAG TAGGCTTCA GGGTCCGGCG TTCCAAGGTT AACCGGCAAT AGTGAGTGAC

GGCTGCGTGG TTGCCCCAGA CGGTATTGAA TCATTGGGCA CCGTCTTCTC TGAGATTGGT GATGTCATCA TGGCGGCGAG CACCAACGAT GGAAGGCCA
CGGAGCGACC AACGGGGTCT GCCATAACTT AGTAACCGT GGACAAGGAG ACTCTAACCA CTACAGTAGT ACGCGCGCTG GTGGTGCTA CTTTCCGGT

TGTGCGTGA GTTACCCCT GAGTCAGTGC TGAGCCCAAC GGTCTCTATC ATTTGTCTCC GCTGTGTCGA ACAACTTCTC GCGAATAAT AAAAGGATT
AACCGGCGT CAAGTGGGA CTCAGTCAGC ACTCGGCTG CCCAGGATAG TAAACAGGG CGACACAGCT TGTTCAGAG CGCTTGATTA TTTTCTTA

TGATTCTGA CTTCTCCAGC AACACTGAAA GTTCTCAAGC CTTACTTGGG TAACCCCACT CCAACCCCTG AGGAGGCAAT TGAGGTGTTT ACCCCCTGA
ACTAAGTACT CAAGAGTTCG TTGTGACTTT CAAGAGTTGC GGTGAACTT ATTCGGGTGA GCTTGGGACC TCCTCCGTTA ACTCCACAAG TGGGCGGACT

CGCTGGGTGA ATACGATGAC GTGCACATCG CAGCGCTGCT TCGGACCATC CGTACTCGCG GTGAGCAGTT CGCTGATATT CCGGCGCGTG CCAAGGCATT
GGACCCACT TATGCTACTG CAGCTGTAGC GTGCGACGA ACCTGTGTAG GCATGAGCGC CACTCGTCA GCGACTATAA CCGCGCGGAC GGTTCGCTAA

CCTCGCGCGG GCTCGTCCGT TCCCGATTAC TGGCGCAGGT TTGTAGATT CCGCTGCGAC TGGTGGCGAC GGTGCCAACA CCATCAACAT CACCAACGGG
GGAGCGCGCG CGAGCAGGCA AGGGCTAATG ACCGCTCCA AACGATCTAA GGCAGCGGTG ACCACCGCTG CCACGGTGT GTAGTTCTA GTGGTGGCG

GCTTCCCTGA TCGCAGCATC CGGTGGAGTG AAGCTGGCTA AGCACGGCAA CCGTTCAAGT AGCTCCAAGT CCGGTTCCCG CGATGTGCTG GAGGCGCTGA
CGAAGGACT AGCTGCTAG GCCACCTCAC TTGACCGAT TCGTGGCGTT GGAAGTCAC TCGAGGTTCA GCGCAAGCGG GCTACACGAC ATCCGCGACT

ATATTCTTTT GCGCCTTGT GTGGATCGTG CTGTGAAGTG GTTCGAAGCG TCCAACCTCA CTTTCTGTT CACACCTGCG TACAACCTG CGATTGCGCA
TATAAGGAAA CCGGGAATA CACCTAGCAC GACACTTCAC CAAGCTTCG AGGTTGAAGT GGAAGGACAA GTGTGAGCG ATGTTGGGAC GCTAACCGT

TGTGCAGCGG GTTCGCCAGG CGGTGAAATT CCCACCATC TTCAACACCG TTGACCAAT CTTGTCCCGG CCGCGCGCGG AGCGTCAGAT CATGGGCGTG
ACAGCTCGG CAAGCGGTCC GCGACTTTAA GCGGTGCTAG AAGTTGTGCG AACCTGGTAA CGACAGCGCG CCGCGCGCGG TCGGAGTCTA GTACCCGAC

GCAATGCCA ATCATGGACA GCTCATCGCC GAGCTCTTC CCGAGCTGG CCGTACACCG GCGCTTCTTG TGCATGGCGG AGGCACCGAT GAGATCGCAG
CGGTACCGT TAGTACCTGT CGAGTAGCGG CTCAGAAAG CCGTCGACCC GGCATGTGCG CCGGAACAAC ACGTACCGCG TCCGTGGCTA CTCTACCGTC

TCCACGGCAC CACCTTGGTG TGGCAGCTTA AAGAAGACCG CACCATCGAG CATTACACCA TCGAGCGCTGA GGACCTTGGC CTTGGCGCGT ACACCTTGA
AGGTGCGCTG GTGGAACCA ACCCTCGAAT TTCTTCTGCC GTGCTAGCTC GTAATGTGCT AGCTCGGACT CTTGGAACCG GAACCGCGCA TGTGGCACT

CGATCTCGTG GTGGCGCTCG GCACTGAGAA CCGGGAAGCT ATCGCGGCTA CTTTCCCGGG CACCGCGCCT GATGCACACC GTGATCGCTT GCGTGGCTCC
CCTAGAGCAC CCACCGGAGC CGTACTCTT CCGGCTTCCA TACGCGCGAT GAAAGCGGCC GTGGCGGGA CTACGTGTGG CACTACGCA CCACGCGAG

GCAGGTGCGA TGTCTATCT CAACGGCGAT GTGACTCTT TGAAGGATG TGCACAAAAG CCGCTTCTCT TGTGTGCGGA CCGGACGACC CAGGATGCT
CGTCACGCT ACAAGATAGA GTTGGCGCTA CAGCTGAGGA ACTTCTTACC ACGTGTGTTT CCGGAAAGGA ACGAACGCT CCGCTGCTGG GTCCGTACCA

特開昭62-244382 (4)

TGGCCAAGCA CGAAGAGATC GATTACTCAG AAAAGGAGTC TTCCAATGAC TAGTAATAAT CTGCCCCACGG TGTGGAAAG CATCGTCGAG GGTGCTCGG
 ACCGGTTCCG CTCTCTCTAG CTAATGAGTC TTTTCCTCAG AAGCTTACTG ATCATTTATTA GACGGGTGCC ACAACCTTTC GTAGCACCTC CCAGCAGCGC

 GACACCTGGA GGAATTCGC GCTCGCATCG CTCACGTGGA TGTGGATGCG CTTCCTAAAT CCACCCGCTC TCTGTTGAT TCCCTCAACC AGGGTAGGGG
 CTGTGCACCT CCTTAAGCG CGAGCGTAGC GAGTGCACCT ACACCTACGC GAAGGTTTTA GGTGGGGCAG AGACAAGCTA AGGGAGTTGG TCCCATCCCC

 AGGGGCGCGT TTCATCATGG AGTGCAGTC CGCATCGCCT TCTTTGGGAA TGATTCTGTA GCACTACCAAG CCGGGTGAAA TCGCTCGCGT GTACTCTCGC
 TCCCGCGCGA AAGTAGTACC TCAGCTTCAG GCGTAGCGGA AGAAACCCCT ACTAAGCACT CGTGATGGTC GGGCCACTTT AGCGAGCGCA CATGAGAGCG

 TACGCAGCGG CAATTTCCGT GCTGTCCGAG CCGGATCGTT TTGGTGGCGA TTACGATCAC CTCGCTACCG TTGGCGGTAC CTCTCATCTT CCGGTGCTGT
 ATGCGTCCCG GTTAAAGGCA CGACACGCTC GGCTAGCAA AACCAACGCT AATGCTAGTG GAGCGATGGC AACCGCGATG GAGAGTAGAA GCGCACGACA

 GCAAGAGCTT CATCATGAT CCTGTCCAGG TACGACCGGC GCGTTACTTT GGTGCTGATG CCATCCTGCT CATGCTCTCT GTGCTTGATG ATGAAGAGTA
 CGTTTCTGAA GTAGTAAGTA GACAGCGTCC ATGCTGGCGG CGCAATGAAA CCACGACTAC GGTAGGACGA GTACGAGAGA CACGAAGTAC TACTTCTCAT

 CGACCGACTC GCTGCGGAGG CTGCGCGTTT TGATCTGGAT ATCCTCACCG AGGTTATTGA TGAGGAGGAA CTCGCGCGCG CCATCAAGCT GGTGCGGAAG
 GCTGCGTGAG CGACGCGTCC GACGCGCAAA ACTAGACCTA TAGGAGTGCG TCCAATAACT ACTCTCTCTT CAGCGGGCGG GGTAGTTGGA CCGACGCTTC

 ATCTTTGGCG TCAACCAACG CAACCTGCAT GATCTGTCCA TTGATTGGGA TCGTTACAGT CGCCTGTCCA AGCTCATTCG AGCAGATGCC GTGCTGCTGT
 TAGAAACCGG AGTTGCTGGC GTTGGAGCTA CTAGACAGGT AACTAAACCT AGCAAGTGCA CGGACAGGT TCGAGTAAGG TCGTCTACGG CACGAGCACA

 CTGAGTCTGG CGTGCGCGAT ACCGAAACCG TCGCGCAGCT AGGTGGGCAC TCGAATGCAT TCCTCGTTGG CTCGCGAGTG ACCAGCCAGG AAAACGTGGA
 GACTCAGACC GCACGCGCTA TGGCTTTGGC AGGCGGTGGA TCCACCGCTG AGGTTACGTA AGGAGCAACC GAGGCTCGAC TGGTGGTCC TTTTGCAGCT

 TGTGGCAGCG CGCGAATTGG TCTACGGCGC CAACAAAGTC TCGGAGCTCA CTTACCAAG TGCAGCACAA ACCGCTCGCG CAGCGGGTGC GGTCTACGGC
 AGACCGTCCG CGCGTTAACC AGATGCCGGG GTTGTTCAG ACGCTGAGT CGAGTGGTTC ACCTCGTCTT TGGCGAGCGG GTGCGCCACG CCAATGCGCG

 GGGCTCATCT TCGAAGAGGC ATCGCCACGT AATGTTTCAC GTCAAAATC GCAAAAAATC ATCGCGCGAG AGCCCAACCT GCGCTACGTC GCGCTACGCC
 CCGGAGTAGA AGCTTCTCCG TAGCGGTGCA TTACAAAGTC CACTTTGTAG CTTTTTTAG TAGCGCGCTC TCGGTGGGA CGGATGCGAG GCGCAGTCCG

GTGCGACCTC CCGGTACAAAG GATTGCTTG TCGACGGCAT CTTCGCGCTA CAAATCCAGG CCCCAGTCCA GGGCAGCGTC GAAGCAGAAA AGGCATTGAT
 CAGCGTGGAG GCGCATGTTT CTAACGAAAC AGCTGCCGTA GAAGCGGCAT GTTTAGGTGC GGGGTGACGT CCGCTCGCAG CTTCGTCTTT TCCGTAACTA

 CGCGCGCGTT CGTGAAGAGG TTGGACCGCA GGTCCAGGTC TGGCGCGCGA TCTCGATGTC CAGCCCGTTG GGGGTGAAAG TGGCAGAGGG TGACGTCCAT
 GCGCGCGCAA GCATTTCTCC AACCTGGCGT CCAGGTCCAG ACCGCGCGCT AGAGCTACAG CTCGCGGAAC CCGCGACTTC ACCGTCTCCG ACTGCAGCTA

 AAGCTAATTC TTGATGCCCA TCAAGGTGGC AGCGGGGAAG TATTGCACTG GGCTACGGTG CCGCGCGCTG TGAAGGCAAA GTCTTTGCTC GCGGGAGGCA
 TTGATTAAG AACTACGGCT ACTTCCACCG TCGCGCGCTC ATAAGCTGAC CGGATGCCAG GCGCGCGGAC ACTTCCGTTT CAGAAACGAG CCGCTCTCGT

 TCTCTCGGGA CAACGCTGCG CAGGCACTCG CTGTGGGCTG CGCAGGTTTA GACATCAACT CTGCGCTGGA ATACCCCGCC GGTGCAAGGA CGTGGGGCTG
 AGAGAGGCGT GTTCCGAGCG GTCCGTGAGC GACACCGGAC GCGTCCAAAT CTGTACTTGA GACCGCACCT TATGGGCGCG CCACGTCCGT GCACCCCGAC

 GCGCGAAAGA TCGCGGCGCG CTGCTGAAA TTTTCGCGC CATCTCCACA TTCCATTACT AAAGGTTAA ATAGGATCAT GACTGAAAA GAAACTTTGG
 CCGCGTTCT ACAGCGCGCG GACGACTTTT AAAAGCGCTC GTAGAGGTGT AAGGTAATGA TTTCCAAAT TATCCTAGTA CTGACTTTT CTTTTGAACC

 GCGGCTCCAC GCTGCTACCT GCATACTTCG GTGAATTCGG CCGCCAGTTC GTGCGGAAT CCTCTCTGCC TGTCTCTGAC CAGCTGGAGA AGGCTTCTGT
 CCGCGAGCTG CGACGATGGA CGTATGAAG CACTTAAGCC GCGGCTCAG CAGCGCGCTA GGGAGGACGG ACAGAGGCTG GTGACCTCT TCGGCAAGCA

 TGACGCGACC AACAGCCAG AGTTCCGCGA AGAACTCGGC GCGTACCTCC CGGATTATCT GGGCGCGCA ACCCGGCTGA CCGAATGCTC CAACCTGCCA
 ACTCGCGTGG TTCTCGGCTC TCAAGCGCT TCTTACCGC CCGATGCGAG CGCTAATAGA GCGCGCGGCT TGGGCGCACT GGTATTACGAG GTTGGAGCGT

 CTCGAGCGG AACGCAAAAG CTTTGGCGG ATCTTCTCA AGCGCGAAGA CCTCGTCCAG GCGGTTGAC ACAAACCTAA CCAGGTGATC GCGCAGGTGC
 GAGCGTCCG TTTCCGTTCC GAAACGCGC TAGAAGGAGT TCGCGCTCTT GAGCAGGTC GCGCACGCTG TGTTTTGATT GGTCCACTAG CCGTCCACG

 TGCTTGCCAA GCGCATGGCG AAAACCCGCA TCATCGCAGA CACCGCGCGA GCGCAGCAG GACCGCGCAC CGCTCTCGCA TGTGCGCTCA TGGGCTTCCA
 ACGAAGCGT GCGGTACCGG TTTTGGCGT AGTAGCGTCT CTGCGCGCGT CCGGTCTGTC CGTGGCGGTC GCGAGAGCGT ACACGCGAGT ACCCGGAGCT

 GTGCGTTGTC TACATGGCG CCAAGGACGT TCGCGCGCGC CAGCGCAAG TCTACCGCAT GCAGCTGCAC GCGCGGAAG TCATCCCGT GGAATCTGCT
 CACGCAACAG ATGTACCGCG GGTTCCTGCA ACGCGCGGTC CTCGCGTTGC AGATGGCGTA CGTCAAGCTG CCGCGCTTCC AGTAGGGGA CTTTAGACCA

特開昭62-244382(5)

TCCGGCAGCC TGAAGGACGC CGTGAATGAA CGCGTGGCGC ATTGGACCGC AACCTTCCAC GAGTCCCACT ACCTTCTCGG CACCCGCGCC GCGCGCAGC
AGGCCGTGGC ACTTCTCGC GCACCTTACTT CGCGACGCGC TAACCTTGGC TTGCAAGGTC CTCAGGGTGA TGGAGAGCC GTGGCGCGCC CCGGGCGTGG

CATTCCCAAC CATCGTGGT GAATTCACCA AGGTGATCTC TGAGGAAGCC AAGGCACAGA TGCTAGAGCC CACCGGCAAG CTTCGGCAGC TTGTGGTGGC
GTAAGGTTG GTAGCAGCCA CTAAAGGTGT TCCACTAGAG ACTCCTTCCG TTCCGTGTCT ACGATCTCGC GTGGCGGTTG GAAGGCTGCG AACACGAGCC

CTGTGTGGT GGTGGCTCCA ACGCCATCGG CATGTTCCGA GACTTCATTG ACGATGAAGG CGTAGAGCTC GTGGCGGCTG AGCCAGCGCG TGAAGGCTC
GACACAGCCA CACCGAGGT TCGGTAGCC GTACAAGCCT CTCAGTAAC TGCTACTTCC GCATCTCGAG CAGCGCGGAC TCGGTGGCC ACTTCCGAG

GACTCGGCA AGCAGGCGC AACCATCACC AACGGTCAGA TCGGCATCCT GCACGGCACC GGTTCCTACC TGATCGGCAA CTCGACGGC CAAGTGGAG
CTGAGGCGT TCGTGGCGG TTGGTAGTGG TTGCCAGTCT AGCGTAGGA CGTGGCGTGG GCAAGGATGG ACTACGCGT GAGGCTGCGG GTTACCTTC

AGTCTACTC CATCTCGCC GGACTTGATT ACCCAGCGGT CGGCCACAGC ACGCACACCT GCACGCCACC GCGCGCACT ACGTTGGTAT CACCGACGCC
TCAGGATGAG GTAGAGCGCG CCTGAACATA TGGGTCCGCA GCGGTGTCTG TCGGTGTGGA CGTCCGCTGG CCGCGCGTGA TGCAACATA GTGGCTCGCG

GAAGCGCTCC AAGCATTCGA GTAGGCTCGC CGGTACGAA GGCATCATCC CGCGCACTGG AATCTCACA CGGTTCCGC TACGACTCAA GCGCGCAAG
CTTGGGAGG TTGTAAGGT CATCGGAGCG GCGATGCTT CGGTAGTAGG GCGCGTGACC TTAGGAGTGT CCGCAAGCGG ATGCTGAGTT CCGCGCGTCC

ACCGCGAAG AGGAAGGCCA GAACCTAAC ATCCTCGTCT CCCTATCCGG CGGTGGCGC AAGGACGTTG ACGATCGCGC CGGCACCTC GAAGAAATC
TGGCGGTTG TCGTCCGGT CTGAATTGG TAGGAGCAGC GGCATAGGCC GGCACCGCTC TTCTGCAAC TCGTAGCGCG GCGGTGGGAG CTCTTTTTAG

CAGAACTGAT CCTGAAGGAC AACCGATGAG CGGTACGAG CATCTTTTG GCGACGCTC GACAGGGTCA GGGAGGGCG CCTTGTTC CTTCATCATG
GTCTTGACTA GGACTTCTG TTGGCTACTG GCAATGCTG CTAGAAAAAC CGTGGCGAG CTGTCCAGT CCGTCCCGC GGAACAAGG GAAGTAGTAC

CTGAGCGACC CTTCACGAGA GAGGGCTTTC CAGATCATCT CCACAGCAAT CGAACGTGGC GCAGATGCAC TGGAACTTGG CGTACCTTTC TCGGACCCAG
GACTCGCTGG GAAGTGGTCT CTTCCGAAG GTCTAGTAGA GGTGTGTTA GCTTGCACCG CGTCTACGTG ACCTTGAAAC GCATGGAAG AGGTGGGCTC

TTGGCGATGG CCGCACCGTC GCGGAATCC ACCTCGCGC ACTCGAGCG GCGGCCACCG TAGACAGCGC ACTCGAGCAG ATCAAGCGCG TCGCGGAGC
AACGCTACC GCGGTGCGC GCGCTAGGG TGGAGGCGCG TGAGCTGCGC CCGCGGTGGC ATCTGTGCGG TGAGCTGCTC TAGTTCGCGC ACGCGGCTCG

CTACCGAGAG GTTCCCATCG GAATGCTCAT CTACGGCAAC GTTCTTTCA CCGTGGGCTT GATCGCTTC TACCAAGAGT TCGTGAAGC TGGCGCAGAC
GATGGGTCTC CAAGGGTAGC CTACGAGTA GATGCGGTC CAAGGAAGT GCGCACGGA CCTAGCGAAG ATGTTCTCA AGCGACTTCC ACCGCTCTC

TCCATCTCC TCGCAGAGT CCCAGTCCG GAAGCGGAC CGTTTTCTG AGCAGCGGA GTTCATCCA TTACATCGC TCGGCGCAAC GCGAGCGAGA
AGGTAGAGG ACGGTCTGCA GGTGAGGCG CTTCGCGTG CCAAGAGCG TCGTGGGCT TAAGTAGGT AAATGTAGC AGGCGGTTG CGGTGCTCT

AAACCTCGA GGTGTCTCC GCGCATCAA AGGGTACAT CTACGCCATC TCGCGGAGC GGTACCGG CACCGAAGT GAATCATCCA CCGAGGCGCT
TTTGGAGCT CCCACAGAG GCGGTAGTT TCCGATGTA GATGCGGTAG AGGCGGCTG CCGAGTGGC GTGGCTTGA CTAGTGGT GGTGCGGGA

GTGGCGAGT GTGACAACA TCAAGAAAT TGATGGCGCA CCCATCTCT TGGGCTTGG GGTCTCATCC CCTCAGCAG TGGCAGAGC GATTGAGCG
CAGGCGTCA CACCTGTTGT AGTTCTTAA ACTACCGCT GGTAGGAGA ACCCGAAGC CTGAGTAGG GGAGTCTGC ACCGTCTGC CTAACTGCG

GGTGTTCG GTCGATCAC GGTTCGCG ATCACCAGA TCATTGCTT CCACTGCGAA GGTGAGCACC CGAACCCCTC CACCATTCGA GATATGGAG
CCACGAAGC CAGGCTAGT CCAAGGCGG TAGTGGTCT AGTAAGGAAG GGTGAGGCT CCACTGCTG GCTTGGGAG GTGGTAAGCT CTATACCTG

GTTGAAGAA GATCTCACT GAGTTCATCT CTGCGACTGA AGGCAGCAG CAAGAAGGT TAGGCTTTA AATGTGGCAA TGTTCACCT GAAACATTCT
CAAACTTCT CTAGAGTGA CTCAAGTAGA GACGCTGACT TCGGTGCTG GTTCTTCAA ATCCGGAAT TTACACGCT ACAAAGTGA CTTTGTAAGA

GAGAGAAAT AGAAACATCA AAGAAAGCAC CTCTAGCTC TCGGGCTGG AGCGCGCTT TTTTTCGG GTTTAGGAAA TCTAGGGGT TTGGAGATCT
CTCTTTACA TCTTTGAGT TTCTTGGTG GAGGATCGAG AGCGGAGCC TCGCGGAG AACAACAGC CAAATCTTT AGAGTCCCA AACCTCTAGA

TAGCTTCGAG CCGTGGGCT AGGAGCGCC GCGGAGGAG CAATCTTAGG GTAGTCCGA GCGCGAGCG TTGGAGTGG ATCAGCTTC GCTTGGCA
ATCGAGCTG GCGCACCGCA TCTGCGGG GCGCTCTCT GTTAGAATCC CATCCAGCT CCGGCTCGC AACCTCACG TAGTGCAAG CCGAAGAGGT

CAGCGCTACC GTTGGAGCT GATCC
GCGCGATGC CAACCTCGA CTAAG

2) 特許請求の範囲第1項記載の各種領域よりなる群から選ばれる1以上よりなるDNA。

3) DNA が人工的に合成されたDNA 又は微生物に由来するDNA である特許請求の範囲第1項又は第2項記載のDNA。

4) 微生物がコリネ型細菌である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

5) 微生物がブレビバクテリウム属に属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

6) 微生物がブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムに属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

7) DNA が1部置換、変異又は削除されたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第6項記載のDNA。

8) DNA がプラスミド又はファージ由来のベクターに組込まれたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第7項記載のDNA。

9) 特許請求の範囲第2およびまたは8項記載のDNA を用いるL-トリプトファンの製造法。

10) 下記第2式ないし第7式のアミノ酸配列をもつペプチド又は蛋白(第2式ないし第7式中

A アラニン、C システイン、D アスパラギン酸、E グルタミン酸、F フェニルアラニン、G グリシン、H ヒスチジン、I イソロイシン、K リジン、L ロイシン、M メチオニン、N アスパラギン、P プロリン、Q グルタミン、R アルギニン、S セリン、T スレオニン、V バリン、W トリアトファン、Y チロシンを示す。

なお、第2式はトリプE酵素、第3式はトリプG酵素、第4式はトリプD酵素、第5式はトリプC酵素、第6式はトリプB酵素、第7式はトリプA酵素のアミノ酸配列を示す。)

第 2 式

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MSTNPVHFSL	DVRYHEDASA	LFAHLGGTTA	DDAALLLESAD	ITTKNGISSL	AVLKSSVRIT	CTGNIVVTQP	LTDSGRAVVA	RLTQQLGOYN	TAENTFSPPA
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SDAVDERERL	TAPSTIEVLK	KLQFESGYSD	ASLPLLHGGF	AFDFLETFET	LPAVEESVNT	YPDYQFVLAE	IVLDINHQQD	TAKLTGVNSA	PGELEAELHK
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
LSLLIDAALP	ATENAYQTP	HGDTLRVVA	DIPDAQFRTQ	INELKENIYN	GDIYQVVPAR	TFTAPCPDAF	AAYLQLRATN	PSPYMFYIRG	LNEGRSYELF
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
GASIESNLKF	TAANRELQLY	PIAGTRPRGL	NPDGSINDEL	DIRNELDMRT	DAKEIADDTM	LVDLARNDLA	RVSVPASRRV	ADLLQVDNYS	RVNHLVSRVT
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
ATLDPELDAL	DAYRACHNMG	TLTGAPKLRA	MELLRGVEKR	RRGSYGGAVG	YLRGNGDMNH	CIVIRSAFVQ	DGVAAVGAGA	GVVROSNPOS	EADETLHKAY
510	520								
AVLNAIALAA	GSTLEVIR								

第 3 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTSPVLIIDNH DSFVYNLYDA FAVAGYKCTV FRNTVPVETI LAANPDILCL SPGPGYPADA GNMHALIERT LGQIPLLGIC LCYQALIEYH GCKVEPCGPV

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
HGTTDMHILT DAGVQSPVFA GLATDVEPDH PEVPGRKVPI GRNLSLGCYV APDGIESLCT CSSEIGDVIH AARTTDCKAI GLQFHPESVL SPTGPILSR

210
CVEDLLAN*

```

第 4 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTSPATLKV L NAYLDNPTPT LECATIEVPTP LTVGEYDDVH IAALLATIRT RGEQFADIAG AAKAFIAAAR PFPITCAGLL DSAGTGGDGA NTINITTGAS

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
LIAASGGVKL AKHGCRSVSS KSGSADVLEA LNIPLGLDGD RAVKWFESHW FTPLFTPAYN PAIAHVQPVH QALXPPTIFN TLGPLLSPAR PERQIMGVAN

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ANHCOLIAEV FRELCRTRAL VVHGAGTDEI AVHGTTLVME LKEDGTIEHY TIEPEDLGLG RYTLEDLVGG LGTENAEAMR ATFACCTGPA HRDALAASAG

310     320     330     340     350
AMPYLNQDGD SLKDGAKRAL SLLADATTOA WLAKHEEIDY SEXESSND*

```

第 5 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTSNHLPTVL ESIVEGRRCH LEEIRARIAI VDVDPALPKST RSLFDSLNGG RGGARFINEC KSASPSLCHI RENYQPGEIA RVYSRYAAAI SVLCEPDRFG

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GDYDHLATVG ATSHLPVLCK DFIIIDPVQVR PARYFGADAI LLHLSVLDD EYDALAAEAA RFOLDILTEV IDEBEVARAI KLGAKIFGVH HRNLHDLSD

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
LDRSRRLSKL IPADAVLYSE SGVRDTETVR QLGCHSNAPL VGSQLTSGEN VDLAARELVY GPNKVCGITS PSAAQTARAA GAVYCGGLIFE EASPRNVSRE

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TSQKIIAAEP NLRVYAVSRR TSCYKDLLVD GIFAVQIHAP LQGSVEAEKA LIAAVREEVG PQVQVHRAIS MSSPLCAEVA EGDVDKLIID ANEGGSGEVF

410     420     430     440     450     460     470     480
DHATVPAAYK AKSLLAGGIS PDNAAQALAV GCAGLDINSG VEYPACAGTW GWCERCRAA ENFRDLHIP LLKV *

```


第 6 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTEKENLGGS TLLPAYFGEF GGFVAESLL PALDQLEKAF VDATNSPEPR EELGGYL RDY LGRPTPLTEC SNLPLAGEGK GFARIFLKRE DLVHGGAHKT

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
NOVICOVLLA KRMGKTRIIA ETGAGQHGTA TALACALHCL ECVVYHGAKD VARQOPNVYR HOLHGAKVIP VESGSGTLKD AVNEALRQWT ATFHESHYLL

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GTRAGPHPPF TIVREFHKVI SEEAKAQMLE RTGKLPOVVV ACVGGGSNAI GNFADFIODE GVELVGAEP A GEGLDGCKNG ATITHGQIGI LNCSTRSYLNR

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
MSDQGVVEESY SISAGLDYPC VGNSTHTCTP PARTTLVSPT PKPSKHSSSL ARYEGIIPT GILTRVRLRL KRAKTAEEEG QNLTLVLSLS GRGDKVDNR

410     420
AGTLEENPEL ILKDNR

```

第 7 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MSRYDDLFGD ASTRSGEGAF VPFIMLSQPS PEEAFQIIST AIERGADALE LGVPPSDPVA DGPTVAESNL RALDGGATVD SALEQIKRVR AAYPEVPIGM

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
LIYGNVPFTR GLDRFYDEFA EAGADSILLP DVPVREGAPP SAAAGIDPIY IAPANASEKT LECVSAASNG YIYALSROGV TGTERESSTD GLSAVDNKK

210     220     230     240     250     260     270     280     290
KFDGAPILLG FGISSPQHYA DAIAGASGA ITGSAITKII ASHCEGENPW PSTIRDMDGL KKDLTEFISA TEGSDQEGLG L

```

11) アミノ酸配列が1部置換、変異、又は削除されたアミノ酸配列である特許請求の範囲第10項記載のペプチド又は蛋白。

12) 特許請求の範囲第10項ないし第11項記載のペプチド又は蛋白をコードするDNA。

13) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のプロモーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

14) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のオペレーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

15) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のアテニューエーターおよび、またはリーダーペプチド領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

16) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のターミネーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、組換えDNA法によるL-トリプトフ

ァンの生産菌の分子育種や生理活性ペプチドの生産に応用可能なコリネ型細菌の、さらに限定すればブレビバクテリウムの、トリプトファンオペロンを含むDNA配列とそこにコードされるアミノ酸配列に関する。

本発明にいうコリネ型細菌(Coryneform bacteria)は、バージース・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー(Bergeys Manual of Determinative Bacteriology)第8版599頁(1974)に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌である。このようなコリネ型細菌のうち特に以下に述べるようなコリネ型グルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。

コリネ型グルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

ブレビバクテリウム・ディバリカタム

ATCC 14020

ブレバクテリウム・サッカロリチウム	
	ATCC 14066
ブレバクテリウム・インマリオフィウム	
	ATCC 14068
ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム	
	ATCC 13869
ブレバクテリウム・ロゼウム	ATCC 13825
ブレバクテリウム・フラバム	ATCC 13826
ブレバクテリウム・チオゲニタリス	
	ATCC 19240
コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	
	ATCC 13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム	
	ATCC 15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・グルタミカム	
	ATCC 13032, 13060
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ	
	ATCC 17965

し(例えばH. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta 72, 619(1963)の方法が使用できる。)、これを適当な制限酵素で切断する。ついで微生物細胞内で複製し得て、かつプロモーター活性をもつベクターに接続し、得られた組換えDNAを用いて、コリネ型細菌もしくはその他の微生物で、トリプトファン生合成系の構造遺伝子が変異を受け、酵素が活性を失ない、そのためにトリプトファン要求性を示すようになっている変異株を形質転換し、該酵素活性が回復、上昇し、トリプトファン要求性が消失する菌株を採取し、これより該構造遺伝子をもつ複合プラスミドを分離できる。

このような方法でも、幸運にしてオペロン全域を単離できる場合もあるが、もしもオペロン全域を単離(クローン化)できなかった場合は、上述の方法により分離した各構造遺伝子の一部もしくは全部をアイソトープ等でラベルしそれらをプローブにして、プラスミドもしくはファージベクターを用いて作成したコリネ型細菌の染色体遺伝子のジーンバンクからコロニーハイブリダイゼイシ

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム	
	ATCC 15354

本発明のコリネ型グルタミン酸生産性細菌には上記のようなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

ここでいうトリプトファンオペロンとは、プロモーター、およびアテニューエーター、さらにリーダーペプチドをコードする領域(trpL)、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE, trpG)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子(trpD)、N-(5'-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子(trpB, trpA)の各構造遺伝子が隣接して配置され、一つの転写単位として機能しているものをいう。

各構造遺伝子を単離する方法は、コリネ型細菌のトリプトファンオペロン、或いは、各構造遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出

ョンにより、単離可能である。

染色体遺伝子を切断するには、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、巾広い種類の制限酵素が使用できる。

本発明のうちトリプトファンオペロンもしくはその1部をトリプトファンの生産に使用する場合に用いるベクターは、コリネ型細菌細胞内もしくはE. coli、B. subtilisにおいて増殖し得るものであればどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

- | | | |
|------|----------|-------------------|
| (1) | pAM 330 | 特開昭58-67699参照 |
| (2) | pAM 1519 | 特開昭58-77895参照 |
| (3) | pAJ 655 | 特開昭58-192900 参照 |
| (4) | pAJ 611 | 同 上 |
| (5) | pAJ 1844 | 同 上 |
| (6) | pCG 1 | 特開昭57-134500 参照 |
| (7) | pCG 2 | 特開昭58-35197参照 |
| (8) | pCG 4 | 特開昭57-183799 参照 |
| (9) | pCG 11 | 同 上 |
| (10) | pCC 1 | 特開 (Mautin/Ajico) |

- (11) pBL 100 特開 ()
 (12) pBR 322
 (13) pC 194

ベクターDNAの断裂は、当該DNAを一箇所で切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

ベクターDNAは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターDNAのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを接続せしめて、ついでプラスミドベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

このようにして得られた、染色体DNAとベクターとの組換えDNAをコリネ型細菌に属する受容菌へ導入するには、エシェリヒア・コリK-12について報告されている様な(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970) 受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方

法、またはパチルス・ズブチリスについて報告されている様に(Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153(1977)) 細胞がDNAを取り込み得る様になる増殖段階(いわゆるコンピテントセル)に導入する方法により可能である。あるいは、パチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に(Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Gen. Genet., 168, 111(1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., Nature, 274, 398(1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Frink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978))、DNA受容菌を、プラスミドDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

プロトプラスト法では上記のパチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得るとができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレン

グリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF 68(セルバ社)などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

クローニングしたトリプトファンオペロン、或いは各構造遺伝子を用いてトリプトファン生産菌の分子育種を行うには、遺伝子のクローニングの際に用いたトリプトファン要求性の変異株を宿主として形質転換した株を用いることができるが、以下に示すような宿主を用いればよりトリプトファンの生産性が高い菌株が得られることがある。

プレビバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, H. Sato, M. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 36, 2315(1972))、プレビバクテリウム属のフェニルアラニンを要求し、m-フ

ルオロフェニルアラニン、5-フルオロトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, S. Sugimoto, M. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 627(1975))、プレビバクテリウム属のチロシンを要求し、5-フルオロトリプトファン、アザセリンに耐性を有する変異株、コリネバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファン、4-メチルトリプトファン、6-フルオロトリプトファン、トリプトファンヒドロキサメート、p-フルオロフェニルアラニン、チロシンヒドロキサメート、フェニルアラニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(H. Hagino, K. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 345(1975))等がある。

このようにして得られたトリプトファン生産能を有するコリネ型細菌を培養してトリプトファンを生成蓄積せしめる方法は、従来コリネ型細菌によるトリプトファンの製造のために使用されていた方法と特に大きく違う点はない。即ち、培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要

に依りアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含む溶液、ホエイ、蜂蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。

培養は好氣的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ、實質的にトリプトファン生産菌が停止するまで行なわれる。

トリプトファン生産菌の分子育種に加え、さらに、本発明によって得られるもう一つの大きな利点は、ブレヴィバクテリウムのトリプトファンオペロンのプロモーターがE.coliのトリプトファンオペロンのプロモーターと同等或いはそれ以上の強い活性を有し、かつその末尾の構造から予測される様に強いターミネーターを有しており、またコリネホルム型細菌内においてトリプトファンにより発現調節を受けるオペレーターを有していることである。E.coliでの異種遺伝子例えば、インク

ーフエロン、成長ホルモン、インターロイキン、神経成長因子、或いはその他生理活性ポリペプチド又は酵素等の発現又は異種蛋白の過剰生産においては、E.coliトリプトファンプロモーター、オペレーター、及びターミネーターが緊用されている。即ち、本発明によって得られたトリプトファンオペロンは、コリネホルム型細菌におけるトリプトファン生産菌の分子育種を勿論促進するが、さらにE.coli系、或いは他のコリネホルム型細菌における遺伝子の強力な発現、及びその調節を行い得るプロモーター、オペレーター、及び、ターミネーターを有するものであり、このDNA配列を用いて上記の異種遺伝子を強力に発現し、過剰生産することが可能である。

また、本発明のDNA配列のうち、遺伝子の発現に関与する部分であるプロモーター領域、オペレーター領域、アテニューエーター領域ならびにリボソーム結合領域の塩基配列、及びターミネーター領域の塩基配列を各々単独で、或いはいずれかを組合わせた形で（取り出して）使用する場合、あ

るいは、各酵素の構造遺伝子の塩基配列について、コードされたアミノ酸配列が異なるように置換して得たDNA配列も、更にいえば、本発明のDNA配列の任意の部分の塩基を他のものと置換したり、新たに塩基を挿入したり、又は削除した場合、或いは、塩基配列の一部を転位させた場合に得られる誘導体およびそれにコードされるアミノ酸配列の蛋白も、いずれも遺伝子の発現及びトリプトファン生産菌の分子育種に良好な結果を与えるものと想定され、主要部分を本発明に依存する技術として本発明の範囲に入るものである。

以下、具体例によって本発明のDNA配列を含むブレヴィバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの取得方法、及び本発明のDNAの塩基配列の決定とアミノ酸配列の決定、並びに本発明のDNAを用いて形質転換して得られるコリネ型細菌によるトリプトファンの生産およびプロモーター、オペレーターについて説明する。

実施例1.

アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子のクローニング

1-1 ブレヴィバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンを含む染色体DNAの調製

ブレヴィバクテリウム・ラクトフェルメンタム AJ11225 (PERM-P4370) を1ℓのCMG培地（ペプトン1g/ℓ、酵母エキス1g/ℓ、グルコース0.5g/ℓ、及びNaCl 0.5g/ℓを含み、pH 7.2に調整したもの）に接種し、30℃で約3時間振盪培養を行ない、対数増殖期の菌体を集めた。

この菌体をリゾチーム・SDSで溶菌させたのち、通常のフェノール処理法により、染色体DNAを抽出精製し、最終的に3.5μgのDNAを得た。

1-2 ベクターDNAの調製

ベクターとしてpAJ1844（分子重5.4メガダルトン）を用い、そのDNAを次の様にして調製した。

まずpAJ1844をプラスミドとして保有するブレ
ビバクテリウム・ラクトフェルメンタムAJ12037
を100 mlのCHG培地に接種し、30℃で対数
増殖期後期まで培養したのち、リゾチームSDS処
理により溶菌させ、30,000×g、30分の超遠心
により上清を得た。フェノール処理ののち、2容
のエタノールを加えてDNAを沈澱回収した。これ
を少量のTEN緩衝液(20mMトリス塩酸塩、20
mM NaCl、1mM EDTA (pH 8.0))に溶解後、塩
化セシウム-エチジウムブロミド密度勾配平衡遠
心によりプラスミド画分を分離し、最終的に
pAJ1844 プラスミドDNA 約200 µgを得た。

1-3 染色体DNA断片のベクターへの挿入

1-1で得た染色体DNA 10 µgと1-2で得たプ
ラスミドDNA 5 µgとを制限エンドスクレアーゼ
Pst Iでそれぞれを37℃に1時間保持し、切断
した。65℃にて10分間加熱した後、両反応液を
混合し、ATP及びジチオスレイトール存在下、
T₄ファージ由来のDNAリガーゼによって10℃
に24時間保持しDNA鎖を連結せしめた。ついで

を集め、菌体を0.5 Mシュクロース、20 mMマ
レイン酸、20 mM塩化マグネシウム、3.5 %ベナ
ッセイブロス(Difco)からなるSMMP培地(pH 6.5)
0.5 mlで洗浄した。次いで10 mg/mlのリゾチ
ームを含むSMMP培地に懸濁し30℃で20時間ブ
ロトプラスト化を図った。6000×g、10分間遠
心分離後、プロトプラストをSMMPで洗浄し0.5
mlのSMMPに再度懸濁した。この様にして得られ
たプロトプラストと1-3で調製したDNA 10 µg
を5 mM EDTA存在下で混合し、ポリエチレングリ
コールを最終濃度が30%になる様に添加した後、
DNAをプロトプラストに取り込ませるために室温
に2分間放置した。このプロトプラストをSMMP培
地1 mlで洗浄後、SMMP培地1 mlに再懸濁し、
形質発現のため、30℃で2時間培養した。この
培養液をpH 7.0のプロトプラスト再生培地に塗
布した。プロトプラスト再生培地は蒸留水1 lあ
たりトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン
12 g、KCl 0.5 g、グルコース10 g、
MgCl₂·6H₂O 8.1 g、CaCl₂·2H₂O 2.2 g、

反応液を、65℃にて5分間加熱し、反応液に2
倍容のエタノールを加えて連結されたDNAの沈澱
を採取した。

1-4 アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリ ボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺 伝子、及びトリプトファンシンターゼβサブ ユニット遺伝子のクローニング

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのア
ンスラニル酸シンターゼ欠損株AS60、ホスホリボ
シルアンスラニル酸トランスフェラーゼ欠損株№
38、トリプトファンシンターゼβサブユニット欠
損株№30(いずれもAJ12125を親株とし、N-メ
チル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにより変異処理することにより分離した)をDNA受容
菌として用いた。

形質転換の方法としては、プロトプラストトラ
ンスフォーメーション法を用いた。まず、菌株を
5 mlのCHG液体培地で対数増殖期の初期まで培
養し、ペニシリンGを0.6ユニット/ml添加後、
さらに1.5時間振盪培養し、遠心分離により菌体

ペプトン4 g、粉末酵母エキス4 g、カザミノ酸
(Difco社) 1 g、Na₂HPO₄ 0.2 g、コハク酸ナトリ
ウム13.5 g、寒天8 g及びクロラムフェニコ
ール3 µg/mlを含む。

30℃で2週間培養後、各受容菌について各々
約25000個のクロラムフェニコール耐性コロニー
が出現してきたのでこれを最少培地(2%グル
コース、1%硫酸アンモニウム、0.3%尿素、0.1
%りん酸二水素カリウム、0.04%硫酸マグネシ
ウム7水塩、2 ppm鉄イオン、2 ppmマンガンイ
オン、200 µg/mlサイアミン塩酸塩、50 µg/ml
ビオチン、カザミノ酸(Difco) 3 g/l、クロラ
ムフェニコール10 µg/ml、pH 7.0、寒天
1.8%)にレプリカし、クロラムフェニコール耐
性でかつトリプトファン要求性の消失した株を
AS60を用いた区分から2株、№38を用いた区分
から1株、№30を用いた区分から1株得た。

上記5株からプラスミドを抽出したところ、い
ずれのプラスミドもベクタープラスミドpAJ1844
よりも明らかに大きく、AS60を用いた区分から得

た組換えプラスミドをptrpE36、ptrpE4、№38を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpD3851、№30を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpB301と名付けた。

1-5 再形質転換

1-4 で得た組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301上に各々アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子が存在することを確認するため、ptrpE36、ptrpE4をAS60に、ptrpD3851を№38に、ptrpB301を№30に再度形質転換した。

生じたクロラムフェニルコール耐性コロニーのうちそれぞれ10個を釣り上げ、トリプトファン要求性を調べた。その結果、いずれもが要求性を消失しており、ptrpE36、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼ遺伝子が、ptrpD3851には、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子が、ptrpB301にはトリプトファンシンター

ゼβサブユニット遺伝子が存在することが明らかになった。ただしptrpE4の形質転換株では栄養要求性の消失の程度、及び最少培地上でのアンスラニル酸の蓄積がptrpE36の形質転換株に比較して悪く、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼの遺伝子の一部が欠けているのではないかと示唆された。

1-6 組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の作製

実施例1-2 で用いた方法により組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301を調製し、常法に従い各種制限酵素で切断し挿入DNA断片の制限酵素地図を作製した(第1図)。

実施例2.

ブレバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロン全域のクローニング
ブレバクテリウムラクトフェルメンタム
AJ11225から自然突然変異により分離した5-フルオロトリプトファン抵抗性の№1041(トリプトファンによるアンスラニル酸シンターゼのフィー

ドバック阻害が解除した株)から実施例1で示した方法により染色体DNAを調製し、制限酵素BamHI 或いはSalI、又はXhoIで完全に切断し、E.coliのベクターpUC18(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))の各制限酵素切断部位に連結し、E.coli JM109(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))を形質転換し、X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside), IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside)、アンピシリンを含むし寒天培地にプレーティングした。37℃で24時間培養後出現した白色コロニー合計約1500コロニーをニトロセルロースフィルター上に釣り上げた。実施例1で得たアンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE)を有するptrpE36の1.2kb.のPstI挿入断片をプローブにして、コロニーハイブリダイゼーション(Grunstein, M., Wells, J.: Methods in Enzymology, 68, 379, Academic Press Inc., New York(1979))を行ない制限酵素BamHIを用いた区分から1つ、制限酵素SalIを使用した区分から1つのポジティブクロー

ンを得た。BamHI 区分から得た組換えプラスミドをptrpE97、SalI区分から得たプラスミドをptrpE42と名付け、実施例1で示した方法に挿入DNA断片の制限酵素切断地図を作成した(第1図)。

その結果、ptrpE97はptrpE36、~~ptrpD3851~~、ptrpB301の挿入PstI断片と同じ制限酵素地図を有するPstI断片を有しており、ptrpE42はptrpE36のPstI断片及び~~ptrpD3851~~のPstI断片の一部と同じ制限酵素地図を有していることが明らかとなった。又、ptrpE97とptrpE42は共通のBamHI-SalI断片を有していた。

実施例3

N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(trpC)のサブクローニング及びトリプトファンシンターゼのサブユニット遺伝子(trpA)のサブクローニング

第1図の組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の比較からtrpD遺伝子とtrpB遺伝子の間にtrpC遺伝子が、trpB遺伝子の下流にtrpA遺伝

子が存在するのではないかと考えられていた。そこで各遺伝子の存在を確認するため以下の実験を行った。

3-1 trpC遺伝子のサブクローニング

組換えプラスミド pE97 から第1図に示した約 2 kb. の SstI-EcoRI断片を分離し、SstI, EcoRI で切断した pUC19 (Messing, J., et al., Gene, **33**, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置した。或いは第1図の約 2.6 kb. の SstI-Hind III断片を分離し SstI, Hind III で切断した pUC18 (Messing, J., et al., Gene, **33**, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No. 5889 (trpC60, pyrF287, hisG1, lacZ53, rpsL8, λ^-) を形質転換した。その結果、SstI-EcoRI断片、或いは SstI-Hind III断片を有する組換えプラスミドは、E. coli の要求性を消失させた。

3-2 trpA遺伝子の存在の確認

組換えプラスミド pE97 から第1図に示した

列はブレバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの発現に必要な RNA ポリメラーゼの結合部位 (trp プロモーター)、リボゾームの結合部位、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子 (trpE, trpG)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (trpD)、N-(5-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼインドルー 3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpB, trpA) に対応する DNA 配列、及び停止配列 (ターミネーター) を含むことが判明した。

又、プロモーターと trpE 構造遺伝子との間、転写レベルでの発現調節機構であるリプレッションに關与するオペレーター領域及び翻訳レベルでの発現調節機構アテニュエーションに關与するリーダーペプチド (trpL) をコードする領域とアテニュエーター様構造が存在する領域が存在すると推定された (第3図)。ターミネーターの構造は第6図に示した。

約 2.4 kb. の NruI-BamHI断片を分離し、SmaI, BamHI で切断した pUC18 に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No. 5644 (trpA33, rha-7, λ^-) を形質転換した。その結果、NruI-BamHI断片を有する組換えプラスミドを保持する形質転換株では、トリプトファン要求性の消失が認められた。

実施例 4.

トリプトファンオペロンの塩基配列の決定

実施例 1 で得られた pE36、pD3851、pB301 及び実施例 2 で得られた pE97 を有する形質転換株から各々プラスミドの調製を行った。各々のプラスミドの挿入 DNA 断片について pUC18 或いは pUC19 又は M13mp10 (Messing, J. and Vieira, J., Gene **19**, 269 (1982)) を用いる dideoxy chain termination 法 (Sanger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463 (1977)) により第2図に示した塩基配列決定のための戦略図によって、トリプトファンオペロン全塩基配列を決定した。その結果、次に示す DNA 塩基配列が得られ、この塩基配

実施例 5.

プロモーターの単離と活性確認

塩基配列の決定の結果、推定されたトリプトファンオペロンのプロモーターを単離し、その機能を確認するため、第4図に示したように、pE97、或いは pE36 の EcoRI-Hind III断片 (約 550 bp.) を E. coli のプロモータープロベクター pKK175-6 (アンピシリン耐性 (Ap)、テトラサイクリン (Tc) 感受性) (Brosius, J., Gene **27**, 151 (1984)) にサブクローニングした。得られた組換えプラスミド pP01 は E. coli 中で Tc 耐性を発現した。

さらに、pAM330 由来のトリメトプリム耐性のベクター、pAJ226 の PstI 切断部位に PstI で切断した上記組換えプラスミド pP01 を連結し、ブレバクテリウム AJ11225 を形質転換したところ Tc 耐性の発現が認められた。この組換えプラスミド pP02 を有する形質転換株の Tc 耐性度は第1表に示したように、Trp. 存在下では Tc に対する感受性が増した。従ってこの領域には、プロモーターとオペレーターが存在すると思われる。

第1表 カザミノ酸を添加した最少増地におけるテトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性

	テトラサイクリン耐性度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		トリプトファン添加 ($1\text{ mg}/\text{ml}$)	
	トリプトファン無添加	トリプトファン添加	トリプトファン無添加	トリプトファン添加
ptrpP01 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
ptrpP02 in <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	25	25	5	5
ptrpP03 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
ptrpP04 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
クロラムフェニコール耐性度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
ptrpP05 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <	600 <	600 <
ptrpP06 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <	600 <	600 <
pEB003TR* in <i>E. coli</i>	400	400	200	200

*pEB003TRは*E. coli*のトリプトファンプロモーターを有している

スミド pAJ234 を用いて、L-トリプトファン生産について検討した。

pAJ234 を用い、m-フルオロフェニルアラニン及び5-フルオロトリプトファン耐性株ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム M247 を用いて述べた方法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換株を選択した。かくして得られた AJ12195 (FERM-P8014) を培養し、トリプトファン生産能を調べたところ第2表に示す結果を得た。

培養はトリプトファン生産培地 (グルコース 13.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g、フマル酸 1.2 g、酢酸 3 ml、 KH_2PO_4 1 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g、d-ビオチン 50 μg 、サイアミン塩酸塩 200.0 μg 、メチオニン 40.0 mg、チロシン 65.0 mg、大豆蛋白加水分解液「味液」50 ml、 CaCO_3 5.0 g を水 1 l に含む、pH 6.5) 20 ml を 500 ml の坂口フラスコに入れたものに被検菌株を植えつけ、30℃にて72時間、振盪下に行なった。培養後、遠心上清中の L-トリ

次にプロモーター領域をさらに限定するため、EcoRI-HindIII断片をAluI或いは、HaeIIIで切断し、各断片をpKK756上にサブクローン化した (第5図)。その結果AluI-HindIII断片 (51bp) 及び HaeIII-HindIII (135bp) 上にプロモーターが存在することが明らかとなった。同様の結果を*E. coli*のプロモータープロベクター pKK232-B (Ap耐性、クロラムフェニコール感受性) を用いて得ており、AluI-HindIII断片 (51bp) 上にプロモーターが存在することを確認した。

実施例6.

ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (trpD)、N-(5-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpB, trpA) の増幅によるトリプトファン生産菌の育種。

クローニングしたブレバクテリウムラクトフェルメンタムトリプトファンオペロンのうち trpD, trpC, trpB, trpA の4遺伝子を有する組換えブラ

リプトファンをロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) ATCC 8042 を定量菌株として用いるバイオアッセイ法によって求めた。

第2表 形質転換株のL-トリプトファン蓄積量

菌株	L-トリプトファン蓄積量
M 247	0.16 g/dl
FERM P-8014 AJ 12195 (M 247/pAJ 234)	0.52 g/dl

尚、M 247 を得るためには寄託された AJ 12195 より宿主細胞を扱うことなく宿主細胞中の複合プラスミドを除去することが可能である。即ち、プラスミドは宿主より自然に失われることもあるし、「除去」操作によって除くこともできる (Bact. Rev., 36, p361-405 (1972))。他の除去操作の例は以下の通りである。AJ 12195 を CMG 液体培地に接種し、37℃で一晩培養 (高温処理) 後、培養液を適当に希釈し、クロラムフェニコールを含有し又は含有しない CMG 寒天培地に塗布し、30℃で1~3日間培養する。かくしてクロラム

フェニコール感受性株として分離される株が
M 247 である。

4. 図面の簡単な説明

第1図

組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素
地図

第2図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの塩基配列決定のため
の戦略図

種々の制限酵素で切断したDNA断片をpUC18、
pUC19 或いはM13mp10 にクローン化し、矢印で
示した方向へ、dideoxy 法により塩基配列を決定した

第3図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの制御領域
—ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
trpE構造遺伝子の5'上流域の塩基配列並びに
推定されるアミノ酸配列、及び、予想される

RNA の2次構造—

第4図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の単離、同定のための戦略

第5図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の限定のための戦略

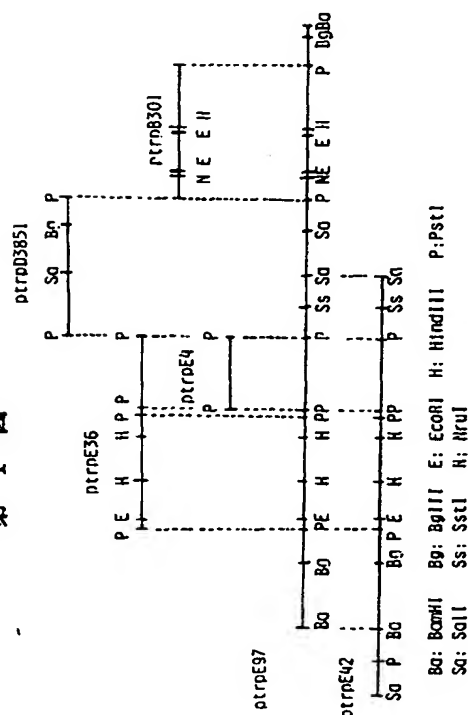
-35 及び-10 はE.coliのプロモーターコンセン
サス配列の-35、及び-10 領域に相当する領域
を示す

第6図

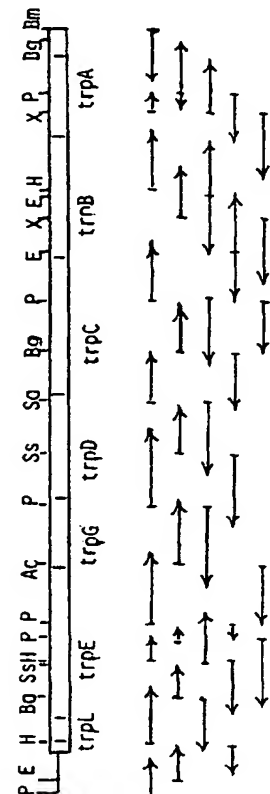
ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンのターミネーターの構
造

特許出願人 味の素株式会社

第1図



第2図



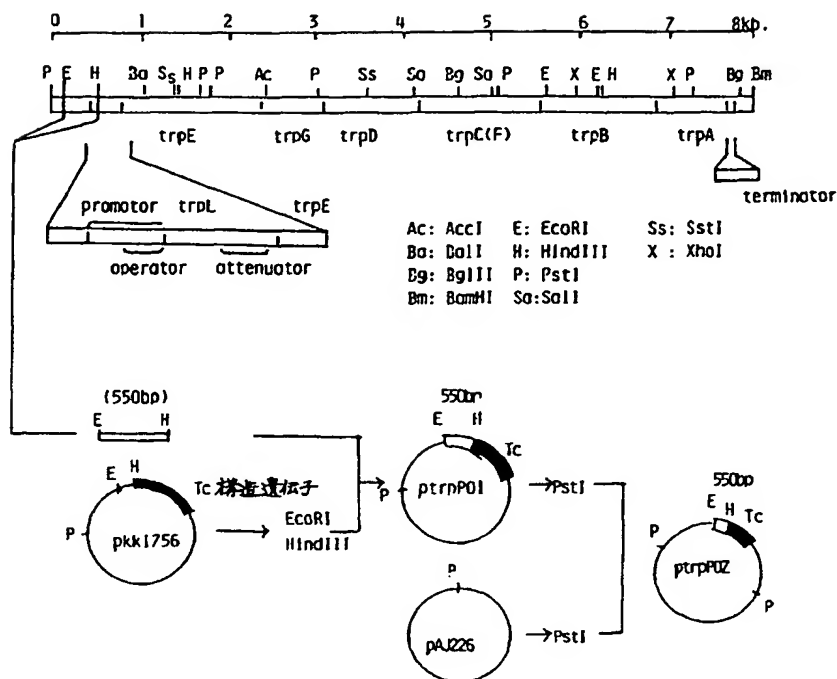
-35 -10 trpL
 TATACACAGAACCACCAAAATGATTAATAATTGAGACAAGCTTCCCACTATGTGATAAAGTCCCATTTTGTGGAATMetAsn

 AsnSerCysLeuSerGIInSerThrGIInTPTPTPTGArgAlaAsn...
 AAATCTTGTCTCAGTCAGCAAGCACCAGTGGTGGCGGTAACTAAGCGAGCCTGACACCTCAAGTTGTGTT
 TCACCTTTTGATGAATTTTAAAGGCTGGTACTCTGTTTCACGAGAAGCGGGGCTTTTGTGGTTTTTAGCCACC
 AAACCGGCAAGCCCTGGATCGAATGAAGCTCGCAGCGAGTAATATTATTGATGTTTCCCAAGANAAGGCTTCAGCCC

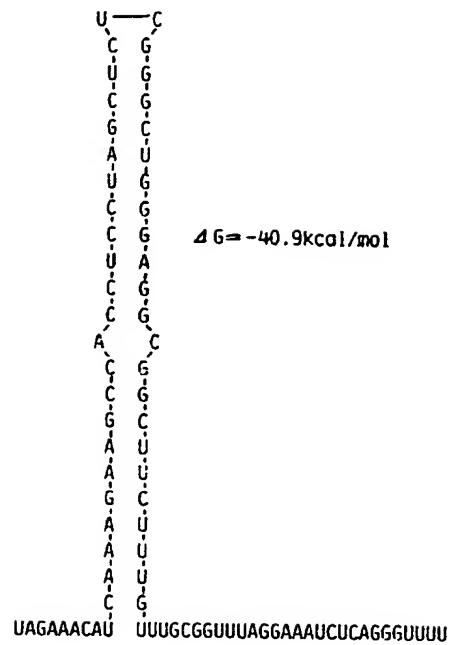
 CACAATGATTTCCACGGTAGGTGCCCATGAGCAGGAATMetSerThrAsn
 trpE

HaeIII
 AGGAGGCGCGG TGGTGTGACT ATTACTCTGG CGATTATCA CAAGACTTCC CTGATATGCC CCAGATTGA
 TCTCTGGGCC ACCACACTGA TAATGGAGGC GCTAATAGT GTTCTGAGG GACTTACGGG GGTTCCTAAT
 HindIII
 -35 -10
 A1u1
 TATCATGAAA CCGCAAAATG ATTTATATTT GAGACAGAGCT T
 ATATGTTCTT GGGTTTATAC TATATATATG CTCTGTCTGA A

第 4 図



第 6 図



第 1 頁の続き

⑤ Int. Cl. 1

// C 12 P 21/02
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:13)
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:15)

識別記号

庁内整理番号

6712-4B

昭和61年6月3日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第87600号

2. 発明の名称

トリアトファンオペロン、トリアトファンオペロンにコード
されるペプチド及び蛋白、トリアトファンオペロンの遺伝子
発現利用方法及びトリアトファンの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中央区京橋一丁目 5番 8号

名称 (006) 味の素株式会社

代表者 取締役社長 歌 山 勝 弘

4. 補正命令の日付

自死

5. 補正により増加する発明の数

なし

6. 補正の対象

明細書中の発明の詳細な説明の欄

および図面（第1図、第2図、第4図）

6. 4

200

圖 1 策

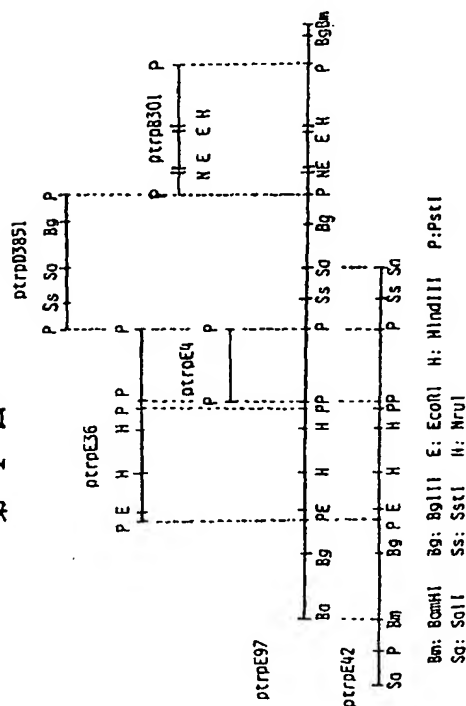
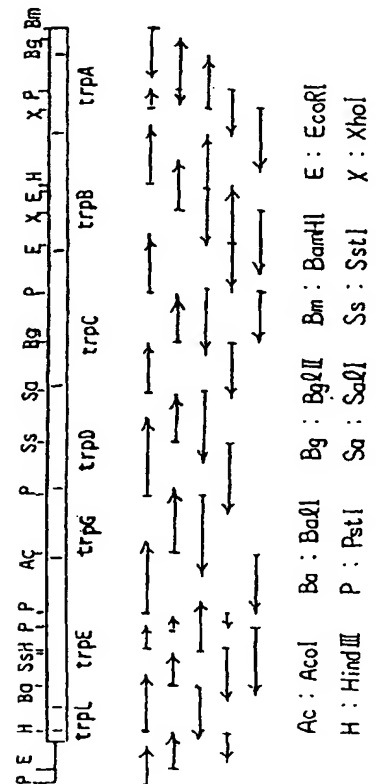


图 2 第



Ac : Acol Ba : BaolI Bg : Bg2II Bm : BamHI E : EcoRI
H : HindIII P : PstI Sa : SaolI Ss : SstI X : XhoI

第 4 図

